



TITLE:

Induction of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Natural Killer Cells for Immunotherapy under chemically defined condition( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Matsubara, Hiroyuki

---

CITATION:

Matsubara, Hiroyuki. Induction of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Natural Killer Cells for Immunotherapy under chemically defined condition. 京都大学, 2019, 博士(医科学)

ISSUE DATE:

2019-11-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22121>

RIGHT:

京都大学	博士（医科学）	氏名	松 原 弘 幸
論文題目	Induction of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Natural Killer Cells for Immunotherapy under chemically defined condition  （ヒト多能性幹細胞由来 Natural killer 細胞を用いた既知組成条件での免疫療法の開発）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>【背景】NK 細胞や T 細胞を含む免疫細胞を用いた養子免疫療法が次世代の治療法として期待されている。中でも、獲得免疫系の T 細胞を用いた研究が先行して行なわれており、白血病やリンパ腫において効果的な結果が得られている。しかし、この戦略では限られた抗原性の細胞以外では効果が期待できない点や、一部が体内長期残存による副作用など、効果と安全面の双方に問題点が指摘されている。このような観点から、より短い寿命で MHC 非依存的に傷害活性を発揮する NK 細胞を用いた細胞療法が T 細胞療法を補完する手段として期待されている。</p> <p>実際に、臨床応用には末梢血から単離した NK 細胞を K562 白血病細胞株との共培養や膜型 IL-15 などによって増幅する方法が用いられている。しかし NK 細胞の細胞傷害活性は、体外増幅中に低下することが知られており、症状が重篤な患者から NK 細胞源を採取し自己由来の細胞ストックを調整することは難しいのが現状である。</p> <p>そこで、大量の NK 細胞を得る細胞ソースとして、ヒト多能性幹細胞（hPSC）に着目した。既に、NK 特異的受容体を発現し、悪性腫瘍に対する細胞傷害性を提示する hPSC 由来 NK（hPSC-NK）細胞の作製に成功した例は報告されている。これらの結果は、免疫療法の新しいリソースとしての hPSC-NK 細胞の有用性を示唆していたが、白血病由来細胞株および血清含有培地の使用、バッチ依存性および汚染の危険性など克服すべきいくつかの問題が露呈していた。</p> <p>【目的】本研究では上記の問題を克服し、異種動物成分を含まない条件で NK 細胞を誘導することを試みた。</p> <p>【結果】複数の hPSC 株を二次元培養し、中胚葉細胞に分化した後、造血前駆細胞を経由して NK 細胞へと段階的に分化誘導を試みた。その際、従来法である血清入りの培地（DMEM+AB-Serum; DM+S）と無血清培地（Stem Line II; ST）の 2 通りで NK 細胞への分化効率および機能を比較検討した。まず先行研究と同様のサイトカインを用いて hPSC-NK 細胞を誘導したところ、いずれの基礎培地を用いても NK 細胞マーカーである CD56 陽性の細胞を誘導できることが確認できたが、率が低く（7.12±1.20%; DM+S, 26.40±6.28%; ST）、ギムザ染色を用いて細胞形態を観察すると骨髓球系細胞が多数存在していた。そこで、NK 細胞への選択的誘導効率を高めることを目的に骨髓球系譜への分化促進にも作用する IL-3 を除去したところ、両基礎培地で予想通り CD56 陽性率を有意に向上することが出来た（87.27±4.52%; DM+S, 87.40±0.61%; ST）。この条件で誘導された細胞は NKG2A（抑制性 NK 受容体）や NKG2D や NKp44（活性受容体）の発現が確認できた。形態的にも直径 10-20μm で核 / 細胞質比が小さく、クロマチン網工は粗荒で細胞内顆粒を有するなど、NK 細胞の特徴をよく示していた。</p> <p>次に hPSC-NK 細胞の機能を評価した。 <i>in vitro</i> では、<sup>51</sup>Cr で標識した K562 細胞と共に 37℃で 4 時間培養したところ、hPSC-NK 細胞の殺傷害率は血清入り条件下 25.4%、無血清培地条件下 23.3%であった。続いて <i>in vivo</i> では、免疫不全 NOG マウスに誘導した hPSC-NK 細胞と Luciferase を発現した K562 細胞を含むマトリゲルを移植し、Luciferase の発光強度を経時的に観察した。いずれの基礎培地条件を用いても</p>			

<p>hPSC-NK 細胞は腫瘍増殖を抑制し、Luciferase の発光強度も有意に低かった。また、生存時間解析から治療群でのマウス寿命の延長が観察できた。これらの結果から、本研究の手法により無血清条件下に誘導した hPSC-NK 細胞は <i>in vitro</i> での白血病細胞株に対する細胞障害能および <i>in vivo</i> での腫瘍増殖に対する抵抗性を発揮することがわかった。</p> <p>【考察】本研究では、hPSC から異種動物成分を含まない無血清培地で NK 細胞を誘導することに初めて成功した。しかし、K562 に対する hPSC-NK 細胞の殺傷害能が末梢血 NK 細胞の約半分程度でまだ十分といえないなど課題もある。今後、NK 受容体を介した樹状細胞とのクロストークなど、hPSC-NK 細胞の機能を向上させる手法の検討も必要と考えられる。</p>
<p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>本研究では、複数の多能性幹細胞(hPSC)株を二次元培養し、中胚葉細胞に分化した後、造血前駆細胞を経由して NK 細胞へと段階的に分化誘導を試みた。その際、従来法である血清入りの培地と無血清培地の 2 通りで NK 細胞への分化効率および機能を比較検討した。誘導された細胞は NKG2D や NKp44 の発現が確認できた。形態的にも直径 10-20μm で核 / 細胞質比が小さく、クロマチン網工は粗荒で細胞内顆粒を有するなど、NK 細胞の特徴をよく示していた。次に hPSC-NK 細胞の機能を評価した。hPSC-NK 細胞の殺傷害率は血清入り条件下 25.4%、無血清培地条件下 23.3%であった。続いて <i>in vivo</i> では、免疫不全 NOG マウスに誘導した hPSC-NK 細胞と Luciferase を発現した K562 細胞を含むマトリゲルを移植し、Luciferase の発光強度を経時的に観察した。いずれの基礎培地条件を用いても hPSC-NK 細胞は腫瘍増殖を抑制し、Luciferase の発光強度も有意に低かった。また、生存時間解析から治療群でのマウス寿命の延長が観察できた。これらの結果から、本研究の手法により無血清条件下に誘導した hPSC-NK 細胞は <i>in vitro</i> での白血病細胞株に対する細胞傷害能および <i>in vivo</i> での腫瘍増殖に対する抑制効果を発揮することがわかった。</p> <p>以上の研究は、hPSC-NK 細胞が臨床応用に繋がると想定して、完全な異種動物成分フリーの無血清条件下で機能的 NK 細胞の誘導を試みている。開発した分化系は将来のヒト多能性幹細胞を用いた新たな治療法の構築に貢献しうる成果であり、免疫学・再生医療の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医科学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、令和元年 9 月 20 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>